

# キャピラリー LC-ICP-MS と Agilent 8800/8900 トリプル四重極 ICP-MS によるペプチドとホスホペプチドの同時定量

## アプリケーションノート

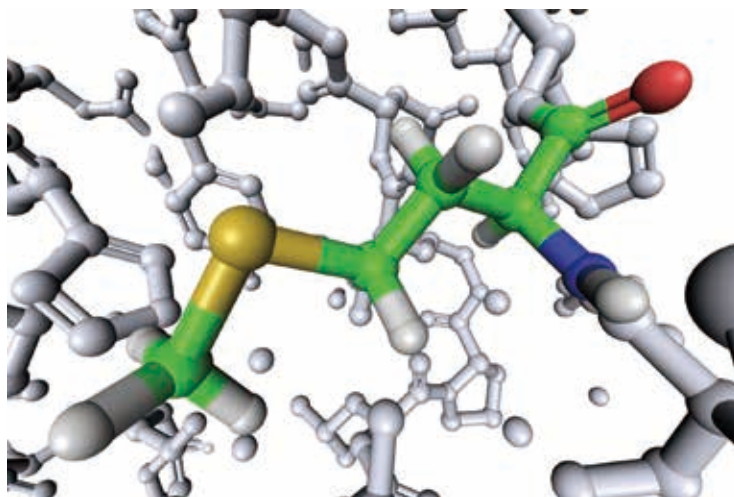
### プロテオミクス

#### 著者

Silvia Diez Fernández<sup>1</sup>,  
杉山尚樹<sup>2</sup>,  
Jorge Ruiz Encinar<sup>1</sup>, and  
Alfredo SanzMedel<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Physical and Analytical  
Chemistry, University of Oviedo, Julián  
Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

<sup>2</sup> アジレント・テクノロジー株式会社



#### 概要

キャピラリー LC (capLC) と Agilent 8800 トリプル四重極 ICP-MS の MS/MS モードのマスシフトモードを組み合わせることにより、ホスホペプチド中のリン (P) と硫黄原子含有ペプチド中の硫黄 (S) の微量分析を可能にしました。ICP-MS 法では報告されていない最高の絶対検出下限を実現することができました。干渉イオン除去も効率的に行われ、S の同位体比も良好に一致し、最良のピークプロファイルと S/N 比を得ることができました。本研究にて、キャピラリー LC と Agilent 8800 トリプル四重極 ICP-MS を繋げ、P 含有ペプチドと S 含有ペプチドの高感度一斉定量の可能性を実証しました。



## はじめに

LC-MS/MS は製薬、バイオ製薬、医療業界分野の研究にてターゲットタンパク質の定量に使われます。従来の手段としては、同位体標識されたタンパク質とペプチドを内部標準溶液として用い、目的のタンパク質を定量します。それとは対照的に、LC-ICP-MS を用いる場合は、目的化合物に含まれるヘテロ原子である S や P を測定し、化合物の形態によらないタンパク質とペプチドの定量を可能にします。この手法では、タンパク質ではない単一のヘテロ原子含有化合物を一般的な標準物質として使用して定量を行います。しかし、P と S の検出限界 (DL) は、双方の高いイオン化ポテンシャルと、四重極 ICP-MS の多原子イオン干渉により、コリジョン/リアクション (CRC) を用いても高くなってしまいます。磁場セクター型 ICP-MS (HR-ICP-MS) を用いても、ラベル化したペプチドの検出限界は ESI-MS/MS で報告されたものとほぼ同等です。表 1 に、今まで報告されている、LC-ICP-MS で測定された P と S の DL をまとめました。本研究では、Agilent 8800 トリプル四重極 ICP-MS (ICP-QQQ) を用い、P と S のヘテロ原子の絶対定量を行い、タンパク質とペプチドの特定を行いました。

従来の四重極 ICP-MS に比べ、Agilent 8800/8900 トリプル四重極 ICP-MS はオクタポールリアクションシステム (ORS<sup>3</sup>) の前方にマスフィルター (Q1) となる四重極を新たに搭載し、その後方に Q2 と呼ばれる四重極マスフィルターを装備しています。このタンデム型質量分析計で、Q1 はマスフィルターとして機能し、目的の測定元素のみをセルに入射させ、他の元素を遮断します。プラズマとマトリクスイオンは Q1 で遮断されるため、ORS<sup>3</sup> での反応プロセスをより確かなものとし、複雑で高濃度のマトリクス存在下においても正確にコントロールして、高感度分析を実現します。クロマトグラムの分離はアジレントのキャピラリー LC システムを用いて行い、その後 Agilent 8800 トリプル四重極 ICP-MS にて定量を行いました。

## 実験

### 試薬と原料

超純水 (日本ミリポア)、HPLC、分析級試薬アセトニトリル、ギ酸 (和光純薬)、ICP-MS 標準溶液 (SPEX 社)、ビス (4-ニトロフェニル) リン酸 (BNPP、純度 99 %)、メチオニン (純度 ≥ 99 % 82) (シグマアルドリッチ社)、ホスホペプチド標準溶液のアミノ酸配列は LRRApSLG と KRSpYEEHIP で、AnaSpec 社 (Fremont, CA, USA) の S 原子含有ペプチド標準溶液の純度は 95 % 以上でした。

表 1. 様々な ICP-MS を用いて測定された、S、P 原子含有種の検出限界

装置	リン			硫黄		
	分離方法	DL (化合物)	参考文献	分離方法	DL (化合物)	参考文献
ICP-QMS コリジョンセル (He)	capLC	110 fmol	1			
	LC	0.97 pmol	2			
	capLC	63 fmol	3			
	CE	19 fmol	2			
ICP-QMS コリジョンセル (Xe)				nanoLC	1.5 pmol	6
				CE	2.6 pmol	7
ICP-QMS DRC (O <sub>2</sub> )	LC	2.2 pmol	4	microLC	2.7 pmol	8
				microLC	3.1 pmol	9
				LC	2.3 pmol	4
HR-ICP-MS	capLC	100 fmol	5	microLC	9 pmol	11
	capLC	50 fmol	10	capLC	11 pmol	12
	capLC			capLC	10 pmol	13
ICP-MS トリプル四重極	capLC	6.6 fmol	本誌	capLC	11 fmol	本誌

## S、P 原子含有標準溶液の調製

BNPP とメチオニンを用い、P と S の濃度が 0、25、50、100、200 ng/mL (元素として) となり、移動相 B (LC グラジェントのスタート時の溶液) を 1 % となるように加え、検量線用標準溶液を調製しました。

## ホスホペプチド溶液の調製

保持時間とペプチドの純度の確認のため、元素濃度 100 ng/mL となるよう 3 種類の溶液を調製しました。溶液 1 は LRRApSLG と ACTPERMAE、溶液 2 は KRSpYEEHIP と VPMLK を加えました。両溶液とも BNPP とメチオニンを約 100 ng/mL となるよう調製しました。溶液 3 は溶液 1 と 2 を重量比で 1:1 となるよう調合しました。

## 装置条件

### キャピラリー LC システム

Agilent 1200 シリーズに逆相キャピラリーカラム Agilent Zorbax SB-C18 (5  $\mu$ m、0.3 x 150 mm) を繋げました。移動相 A と B はそれぞれ水とアセトニトリルを用い、両移動相とも 0.1 % のギ酸と ICP-MS の内部標準溶液として使われる Ge を 10 ng/mL 加えました。注入量は 1~2  $\mu$ L でした。LC 移動相流量は 5  $\mu$ L/min で、LC グラジェントのプログラムは移動相 B を 1 % (一定) に保ち、その後 3~35 分で移動相 B を 60 % までリニアに増加させました。

### キャピラリー LC-ICP-MS (capLC-ICP-MS)

#### インターフェース

キャピラリー LC カラムを、Agilent キャピラリー LC インターフェース (図 1 参照、部品番号 G3680A) に繋げました。これは、小型のスプレーチャンバーと、その内部に搭載された、全量を噴霧するネブライザーから成っています。

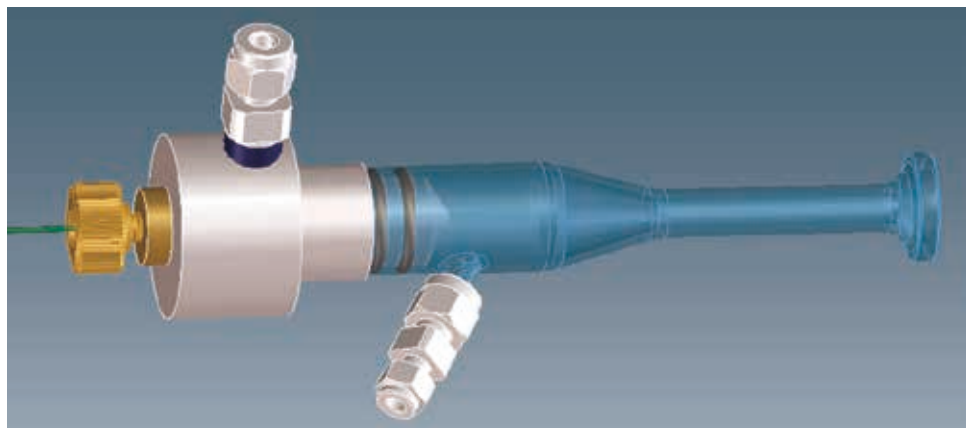


図 1. アジレントキャピラリー LC インターフェースキット (G3680A)

## ICP-MS

Agilent 8800 トリプル四重極 ICP-MS を用い、酸素ガス (Ar:O<sub>2</sub> の混合比が 8:2) を 80 mL/min の流量でネブライザーガスとして加えました。セルガスは酸素を用い、流量は 0.35 mL/min でした。サンプル流量は 5  $\mu$ L/min でした。<sup>31</sup>P、<sup>32</sup>S、<sup>34</sup>S にて積分時間は、150 ms (1 ピークあたり 1 ポイント) でした。30 % アセトニトリルを含む P と S の標準溶液 100 ng/mL をシリンジポンプで流量 5  $\mu$ L/min で注入し、Agilent 8800 にて P と S が最良の検出限界が測定できる条件に最適化しました。LC のオペレーションとクロマトグラムの解析は、全て Agilent ICP-MS MassHunter ソフトウェアにて行いました。

### Agilent 8800/8900 トリプル四重極 ICP-MS の MS/MS モードを用いた S と P の干渉除去

P と S の干渉を除去するために ICP-QQQ の MS/MS マスシフトモードを用いました。図 2 の上部に示した通り、Q1 は m/z=32 に設定されているため <sup>32</sup>S<sup>+</sup> は通り抜けられますが、m/z=48 も含め他の質量数は排除されます。酸素との反応により S<sup>+</sup> は SO<sup>+</sup> に変換されます。その後、Q2 では、m/z=48 に設定されているため、SO<sup>+</sup> のみが検出器に運ばれ、m/z=32 に妨害する干渉物は全て遮断されます。m/z=48 の多原子イオンは Q1 にて既に除去されています。この機構こそが QQQ の干渉除去能力の鍵となります。これにより、コントロールされた、正確かつ干渉のない、反応プロダクトイオンの測定が可能になります。

図 2 の下部 (b) に示したのは P 測定時のものです。Q1 は  $m/z=31$  に設定されているので  $^{31}\text{P}^+$  のみが通過でき、 $m/z=47$  も含め他の質量数イオンを遮断します。 $^{31}\text{P}^+$  はセルでの酸素との反応により  $\text{PO}^+$  に変換されます。Q2 は  $m/z=47$  に設定されているので  $\text{PO}^+$  が検出器に入射できます。質量数 47 を持つ他の多原子イオンは Q1 にて既に遮断されています。Q1 にて遮断された干渉イオンは、 $^{31}\text{P}^+$  に妨害する  $^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$ 、 $^{14}\text{N}^{16}\text{OH}^+$ 、 $^{14}\text{N}^{17}\text{O}^+$ 、 $^{12}\text{C}^{18}\text{OH}^+$  と、 $^{32}\text{S}^+$  に妨害する  $^{16}\text{O}_2^+$ 、 $^{15}\text{N}^{17}\text{O}^+$ 、 $^{15}\text{N}^{16}\text{OH}^+$ 、 $^{14}\text{N}^{18}\text{O}^+$  で、Q2 にて遮断された干渉イオンは、 $m/z=47$  にて  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}$  に妨害する  $^{47}\text{Ti}^+$ 、 $^{32}\text{S}^{14}\text{NH}^+$ 、 $^{32}\text{S}^{15}\text{N}^+$ 、 $^{15}\text{N}^{16}\text{O}_2^+$ 、 $^{12}\text{C}^{35}\text{Cl}^+$ 、 $m/z=48$  にて  $\text{SO}^+$  に妨害する  $^{48}\text{Ti}^+$ 、 $^{36}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ 、 $\text{P}^{16}\text{OH}^+$ 、 $^{31}\text{P}^{17}\text{O}^+$ 、 $^{48}\text{Ca}^+$  でした。

Q1 の存在なしには P と S 由来の多原子イオンは互いに妨害あい、P/S 比や P、S 元素含有イオン種の測定 (リン酸化の計算の誤差)、S の同位体比 (例えば同位体希釈法による定量誤差) に影響を及ぼします。8800/8900 の MS/MS マスシフトモードを用いれば、反応生成物イオンは親イオンとまったく同様の同位体比を持ち、これも従来の ICP-QMS にはない特長です。ICP-QMS には Q1 が存在しないため、S の全同位体ともセルに入射し  $\text{SO}^+$  が生成するため、お互いに干渉し合ってしまう。(例:  $^{32}\text{S}^{18}\text{O}^+$  は  $^{34}\text{S}^{16}\text{O}^+$  プロダクトイオンに  $m/z 50$  にて干渉)

測定に際し、はじめに有機化合物マトリクス (アセトニトリル 30 % をシリンジで連続注入) を用いて検出限界を測定しました。結果は、 $^{31}\text{P}$  で 0.6 ng/mL、 $^{32}\text{S}$  で 1.2 ng/mL で、BEC は  $^{31}\text{P}$  で 9 ng/mL、 $^{32}\text{S}$  で 5 ng/mL でした。水試料においては、これらよりずっと低い値が得られていますが、これはアセトニトリル中に P と S が存在しているためではないかと考えられます。S の干渉イオン除去の確認のため、質量数 34/32 比が測定されました。 $^{32}\text{S}$  の干渉イオンの方が存在比が高いため、算出された 34/32 比が実際のものとはほぼ正しいとしました。ブランク中の 34/32 比 ( $0.0484 \pm 0.0017$ ) は標準溶液のものとはほぼ一致しました ( $0.0487 \pm 0.0012$ )。IUPAC で規定されている  $^{34}/^{32}\text{S}$  の値は  $0.0447 \pm 0.0025$  です。算出されたものと理論値の違いは、マスバイアルによるものだと考えられます。-4.0 % ~ -4.3 % の質量差別因子も参考文献 14~16 に記されている値と一致します。以上のことを踏まえると、8800 ICP-QQQ により、アセトニトリル中にある S も含め、干渉イオンはほぼ全て除去されたと言えます。

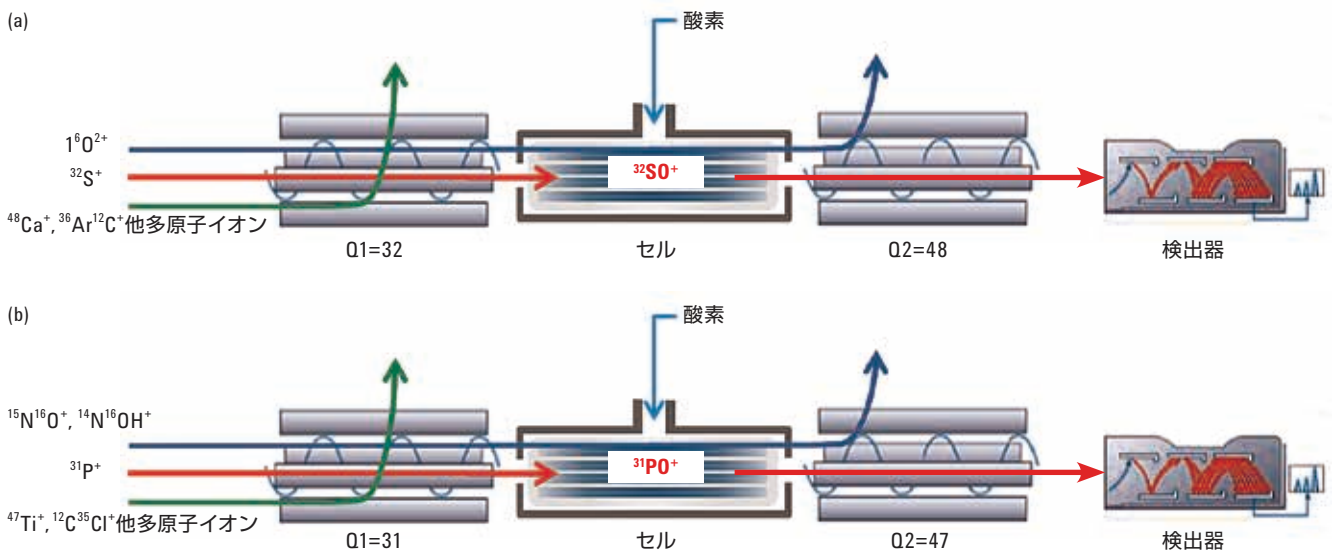


図 2. 8800/8900 ICP-QQQ の MS/MS マスシフトモードでの S (a) と P (b) の干渉除去の仕組み

## 結果と考察

capLC-ICP-MS に切り替え、BNPP で調整した P とメチオニンで調整した S を 0、25、50、100、200 ng/mL で標準試料として測定しました。図 3 に示した通り、検量線は良好な直線性を示し、RDS は 4 % 以下を保ちました。

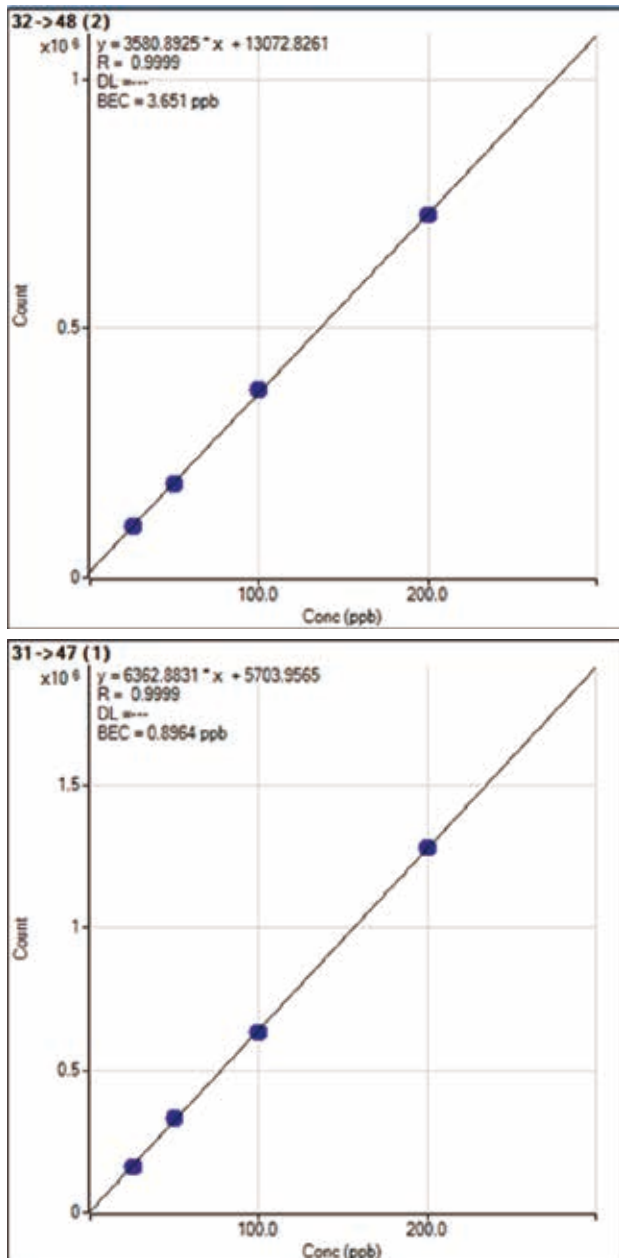


図3. BNPP で調整した  $^{31}\text{P}$  とメチオニンで調整した  $^{32}\text{S}$  の標準溶液 0、25、50、100、200 ng/mL の検量線。  
注入量は 2  $\mu\text{L}$ 、流量は 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ 、グラジェントのプログラムは本文を参考。

50 ng/mL のクロマトグラムを図 4 に示します。S/N 比は両元素において良好な結果を得ることができました。LC-ICP-MS においては、アセトニトリル移動相由来の P と S のバックグラウンドが差し引くことができるため、8800 ICP-QQQ での測定をより正確なものにします。DL は、P で 0.10 ng/mL、S で 0.18 ng/mL (それぞれ 6.6 fmol、11 fmol) となりました。表 1 から分かる通り、この S と P の測定結果は LC-ICP-MS にて測定されたものの中で最良の DL でした。

## ホスホペプチドと S 原子含有ペプチドの測定

次に LC-ICP-MS にてホスホペプチドと S 原子含有ペプチドの測定を行いました。保持時間は以下の「実験」の項目で紹介した溶液 1、2 から算出されました。ペプチドを約 45 ng/mL ずつと、P、S として各 105 ng/mL の標準を含む溶液 3 を、同様の分析条件で測定しました。溶液 3 のクロマトグラムを図 5 に示します。ペプチドと標準溶液において良好な分離を得ることができました。pTyr 含有ペプチドのみテーリングが見られましたが、これはホスホペプチドの不純物だと考えられ、これはシグナルの 9 % に相当しました。S/N 比は素晴らしい結果でした。S 含有ペプチドの DL の平均 (0.26 ng/mL) は メチオニン標準溶液 (0.18 ng/mL S) よりやや高めですが、これはおそらくピーク幅 (24 s) がメチオニンのもの (9 s) より広いためです。P の場合は、検出下限の平均 (0.33 ng/mL P) は BNPP 標準溶液のもの (0.10 ng/mL P) よりやや高く、これは移動相に含まれる炭素存在下 (グラジェントによる) によりリンが増感してしまうためだと考えられます。

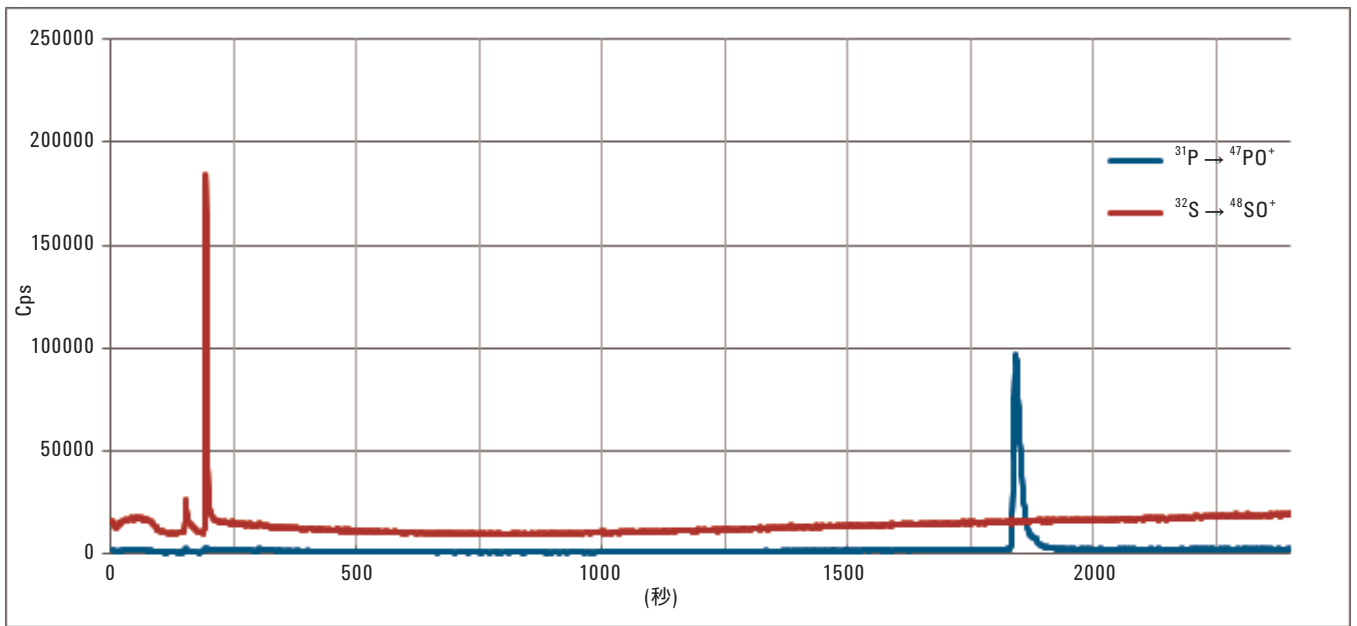


図 4. 50 ng/mL 標準試料のクロマトグラム

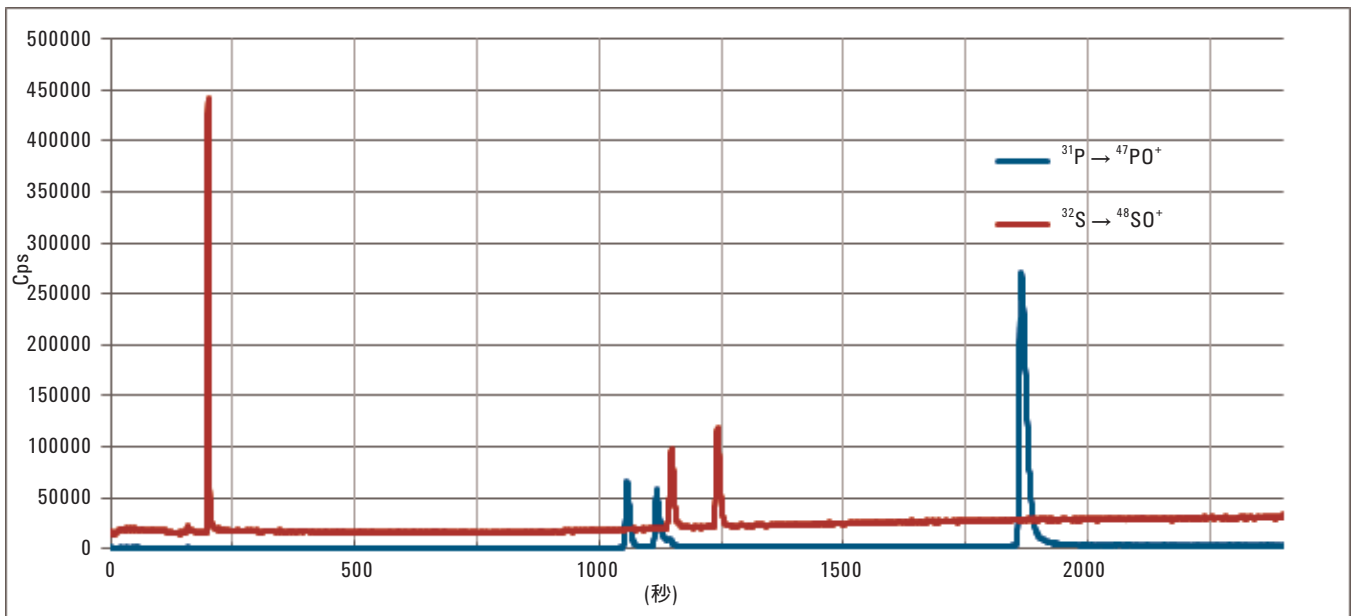


図 5. LRRApSLG、ACTPERMAE、KRSpYEEHIP 含有液、BNPP 含有の VPMLK、メチオニンが混合された溶液 3 のクロマトグラム



## 結論

天然に存在するタンパク質の高感度かつ干渉フリーの ICP-MS 測定により、プロテオミクス分野における LC-ICP-MS システムの使用が実現しました。CapLC-ICP-QQQ を用い、S、P 原子含有種にて 11 fmol と 6.6 fmol という最良の検出下限を算出しました。Agilent 8900 ICP-QQQ #100 (Advanced Applications 構成) では、アルゴンガス流路が再構築されたため、S (および Si) の含有量が低い材料で S に対する優れた検出下限が達成されます。これら 2 元素のバックグラウンドを最小限に抑えられています。

MS/MS マスシフトモードを用い、Agilent 8800/8900 は酸素ガスを、生成物イオンを形成して干渉イオンを低減します。S の干渉イオンの低減も同位体比にて確認できました。また、正確な同位体比が QQQ MS の反応においても保たれるため、グラジエントによる感度の変化を同位体希釈法で補正できます。

ピークプロファイルと S/N 比も最良で、本研究にて初めて、ペプチドとホスホペプチドを同時に定量するために、一般的な標準物質が用いられました。

ご紹介した LC-ICP-MS システムを用いれば、製薬研究や環境分析、ナノテクノロジー分野においての P と S の定量手法に新たな革新をもたらすと確信します。

## 詳細情報

本研究は以下の論文にて詳細を記載しています。[Triple Quad ICPMS (ICPQQQ) as a New Tool for Absolute Quantitative Proteomics and Phosphoproteomics, Silvia Diez Fernández, Naoki Sugiyama, Jorge Ruiz Encinar, Alfredo Sanz-Medel, *Anal. Chem.*, 2012, 84 (14), pp 5851–5857, Publication Date (Web): June 18, 2012]

## 参考文献

1. Pereira Navaza, A.; Ruiz Encinar, J.; Sanz-Medel, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46, 569-671.
2. Pröfrock, D.; Leonhard, P.; Prange, A. J. *Anal. At. Spectrom.* 2003, 18, 708-713.
3. Pröfrock, D.; Leonard, P.; Ruck, W.; Prange, A. *Anal. Bioanal. Chem.* 2005, 381, 194-204.
4. Smith, C. J.; Wilson, I. D.; Weidolf, L.; Abou-Shakra, F.; Thomsen, M. *Chromatographia.* 2004, 59, S165-S170.
5. Wind, M.; Edler, M.; Jakubowski, N.; Linscheid, M.; Wesch, H.; Lehmann, W. D. *Anal. Chem.* 2001, 73, 29-35.
6. Schaumlöffel, D.; Giusti, P.; Preud'Homme, H.; Szpunar, J.; Lobinski, R. *Anal. Chem.* 2007, 79, 2859-2868.
7. Pröfrock, D.; Leonhard, P.; Prange, A. *Anal. Bioanal. Chem.* 2003, 377, 132-139.
8. Hann, S.; Koellensperger, G.; Obinger, C.; Furtmüller, P. G.; Stingeder, G. *J. Anal. At. Spectrom.* 2004, 19, 74-79.
9. Stürup, S.; Bendahl, L.; Gammelgaard, B. J. *Anal. At. Spectrom.* 2006, 21, 201-203.
10. Zinn, N.; Hahn, B.; Pipkorn, R.; Schwarzer, D.; Lehmann, W. D. *J. Proteome Res.* 2009, 8, 4870-4875.
11. Hann, S.; Koellensperger, G.; Obinger, C.; Furtmüller, P. G.; Stingeder, G. *J. Anal. At. Spectrom.* 2004, 19, 74-79.
12. Zinn, N.; Krüger, R.; Leonhard, P.; Bettmer, J. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 391, 537-543.
13. Wind, M.; Wegener, A.; Eisenmenger, A.; Kelner, R.; Lehmann, W. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003, 42, 3425-3427.
14. Clough, R.; Evans, P.; Catterick, T.; Evans, E. H. *Anal. Chem.* 2006, 78, 6126-6132.
15. Becker, J. S. *J. Anal. At. Spectrom.* 2002, 17, 1172-1185.
16. Mason, P. R. D.; Košler, J.; de Hoog, J. C. M.; Sylvester, P. J.; Meffan-Main, S. *Anal. At. Spectrom.* 2006, 21, 177-186.



**[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)**

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる障害について一切免責とさせていただきます。

本製品は研究用です。診断用ではありません。

本書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更することがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2016

Published June 1, 2016

Publication number: 5991-1461JAJP